

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. O. Hornstein

**Autoradiographische ^3H -Thymidin-Doppelmarkierung
in vivo zur Bestimmung der Dauer der DNS-Synthese-Phase
in der Wangenschleimhaut bei erwachsenen
männlichen Ratten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Hans-Ulrich Wilhelm Meisel
aus
Gärtenroth

D 29

1976

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. O.P. Hornstein

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Februar 1976

Untersuchungen über die Dauer der DNS-Synthesephase in der Wangenschleimhaut der männlichen Ratte*

I. Vergleich von zwei autoradiographischen Methoden in vivo

G. H. Schmid, H. Schell, O. P. Hornstein, H. U. Meisel und H. J. Zeissler

Dermatologische Universitätsklinik Erlangen (Direktor: Prof. Dr. O. P. Hornstein)

Eingegangen am 27. Juni 1974

Studies on the Duration of the Nuclear DNA Synthesis in the Buccal Mucosa of Adult Male Rats

I. Comparative Evaluation of Two Autoradiographic Methods in vivo

Summary. In 46 adult male Sprague Dawley rats the duration of the nuclear DNA synthesis of the buccal mucosa epithelium was investigated by the technique of %-labelled mitoses and by double-labelling with ^3H -thymidine. By the former method the length of the S-phase (T_s) was calculated as ranging from 7.5 to 8 hrs and, by the latter method, from 7.65 to 10 hrs.

The wider variation of the data obtained by the double-labelling technique proved to be due to some difficulties in the method. Apparently, the duration of the S-phase in the buccal epithelium of the rats investigated varies to some degree as the frequency distributions of major:minor silver grain density obtained by a high and a low dose of ^3H -thymidine overlap each other in a narrow range. As this overlap of nuclear labelling by two distinct doses of ^3H -thymidine gives rise to some difficulties in the exact determination of the virtual ratio of two groups of nuclei labelled at different times, the real ratio of both nuclear groups revealed by count was corrected mathematically.

As the curve of %-labelled mitoses is influenced by the circadian rhythm of the mitosis index the percentage of mitoses counted in follow-up of the experiment cannot be determined with a constant degree of reliability. Nevertheless, in our studies on the duration of the DNA synthesis in the buccal mucosa epithelium of the rat the method of %-labelled mitoses was proved to give more conclusive results than that of double-labelling by ^3H -thymidine.

Zusammenfassung. Bei 46 erwachsenen männlichen Ratten wurde im Epithel der Wangenschleimhaut die Dauer der DNS-Verdopplungsphase mit Hilfe des %-markierte Mitosen-Verfahrens und der Doppelmarkierung mit ^3H -Thyminid ermittelt, wobei die methodischen Probleme beider Bestimmungen miteinander verglichen wurden. Mit dem %-markierte Mitosen-Verfahren ergaben sich Werte von 7,5—8 Std, bei der ^3H -Thyminid-Doppelmarkierung divergierten die errechneten Werte zwischen 7,65 und 10 Std.

Die größere Streuung der bei der Doppelmarkierung erhaltenen Einzelwerte beruht auf verschiedenen methodischen Schwierigkeiten. Anscheinend schwankt im Wangenepithel erwachsener Ratten die Länge der S-Phase um einen Mittelwert, so daß sich schwache und starke Kernmarkierungen in einem schmalen Markierungsbereich überschneiden. Dadurch wird es schwierig, die genaue Relation zwischen den von der hohen und den allein von der niedrigen Dosis getroffenen Kernen zu ermitteln.

Bei der %-markierte Mitosen-Kurve wirken sich die tageszyklischen Schwankungen in der Höhe des Mitose-Indexes in der Weise aus, daß für die im zeitlichen Ablauf des Experimentes ermittelten Werte die statistische Sicherheit nicht gleichbleibend ist. Nach unseren Ergebnissen erscheint jedoch das %-markierte Mitosen-Verfahren besser als die ^3H -Thyminid-Doppelmar-

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB 118.

kierung zur Bestimmung der S-Phasenlänge im buccalen Schleimhautepithel der erwachsenen Ratte geeignet.

Ausgehend von früheren proliferationskinetischen Studien über die Wangenschleimhaut der männlichen Ratte (Schmid *et al.*, 1973; Schell und Schmid, 1973; Schell *et al.*, 1974) untersuchten wir im gleichen Gewebe die S-Phasenlänge *in vivo*. Dabei stellten wir das Prozent-markierte-Mitosen-Verfahren (Quastler und Sherman, 1959) dem Doppelmarkierungsverfahren mit ^3H -Thymidin (Wegener *et al.*, 1964) gegenüber. Besonderes Augenmerk richteten wir auf methodische Probleme, da die Frage der Anwendbarkeit der DNS-Doppelmarkierung für die Bestimmung der S-Phasenlänge *in vivo* auch für entsprechende Untersuchungen *in vitro* von prinzipieller Bedeutung ist.

Material und Methode

Es kamen 46 männliche Sprague-Dawley-Ratten einer Zucht in den Versuch. Die Tiere waren 4 Monate alt, wogen durchschnittlich 380 g und unterlagen einem künstlichen Hell-Dunkel-Rhythmus (8—20 Uhr hell, 20—8 Uhr dunkel). Sie erhielten Altromin®-Hartfutter und Wasser *ad lib.* und wurden zu fünf in einem Käfig gehalten; die Eingewöhnungszeit betrug 30 Tage.

Gruppe I. 36 Ratten erhielten gegen 9 Uhr vormittags je 500 μC ^3H -Thymidin (Schwarz-Mann Bio Research, New York; spez. Akt. 6 C/mMol) i. p. appliziert und wurden paarweise nach verschiedenen langen radioaktiven Versuchszeiten getötet (nach 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 6; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 18; 20; 24; 28 Std).

Gruppe II a. 8 Ratten erhielten gegen 9 Uhr vormittags 4 verschiedene Dosen von ^3H -Thymidin (je 2 Tiere 50 μC , 100 μC , 500 μC und 1000 μC ; spez. Akt. s.o.) i. p. appliziert und wurden 1 Std später getötet.

Gruppe II b. 2 Ratten bekamen um 9 Uhr vormittags je 50 μC ^3H -Thymidin (spez. Akt. s.o.) und nach 60 min eine 2. Dosis mit 500 μC ; die Tötung erfolgte 30 min nach der letzten Injektion.

Alle Tiere wurden im Ätherrausch durch Dekapitation getötet. Nach Formalinfixierung und Paraffineinbettung wurden von der Wangenschleimhaut 3 μ dicke Schnitte angefertigt, mit dem Stripping-Film AR 10 (Kodak) 18 Tage lang autoradiographisch exponiert und nach dem Entwickeln und Fixieren mit Haematoxylin-Eosin gefärbt.

Auswertung der Autoradiogramme

Als markiert definierten wir — zur sicheren Abgrenzung vom sog. Nulleffekt — nur Zellkerne mit mindestens 4 Silberkörnchen.

Aufstellung der %-markierte-Mitosen-Kurve. Dazu wurden die 36 Ratten der Gruppe I ausgewertet, indem an durchschnittlich 100 Metaphasenkernen/Tier der Prozentsatz markierter Mitosen bestimmt wurde.

Zur Ermittlung der S-Phasenlänge ($= T_s$) mit Hilfe der ^3H -Thymidin-Doppelmarkierung gilt die Beziehung:

$$T_s = \frac{y \cdot \Delta t}{x}$$

Dabei ist y die Zahl der von der hohen Dosis des ^3H -Thymidins markierten Zellkerne und x die Zahl der allein von der niedrigen Dosis getroffenen Zellkerne, die während Δt die S-Phase beendet hatten.

Voraussetzung ist, daß die verwendeten Dosisbereiche alle in der DNS-Synthese befindlichen Zellkerne des Stratum basale markieren. Daher prüften wir an der Tiergruppe II a die Abhängigkeit des ^3H -Indexes von der verabreichten Dosis des ^3H -Thymidins, indem wir an 2000 Zellkernen/Tier den ^3H -Index bestimmten.

Um die unterschiedlich starke Kernmarkierung einem der beiden verwendeten Dosisbereiche zuordnen zu können, muß im *ARG* die Grenze zwischen schwacher und starker Markierung definiert werden. Hierzu wurde an 4 Ratten der Gruppe II a, die paarweise 50 μC bzw. 500 μC ^3H -Thymidini. p. erhalten hatten und 1 Std später getötet wurden, pro Tier an 200 im histologischen Schnitt aufeinanderfolgenden Zellkernen die Anzahl der Silberkörner/Zellkern ausgezählt (= SK/ZK). Die Häufigkeitsverteilungen der SK/ZK beider Dosisbereiche wurden unter Zusammenfassung von Fünfer-Gruppen miteinander verglichen. Dabei konnte der größte Teil der markierten Zellkerne einer bestimmten Dosis des ^3H -Thymidins sicher zugeordnet werden, in einem kleinen Bereich kam es aber zu einer Überschneidung der Markierungen (Abb. 2). Bei der Definition der Grenze zwischen schwacher und starker Kernmarkierung wurde dieser Überschneidungsbereich halbiert, so daß ebenso viele durch die niedrige Erstdosis stark wie durch die hohe Zweitdosis schwach markierte Zellkerne resultierten.

Zur Auswertung der doppelt markierten *ARG* der Tiergruppe II b wurde die Grenze zwischen starker und schwacher Kernmarkierung aus dem Vorversuch übernommen und an mindestens 1000 markierten Kernen/Ratte das Verhältnis der stark zu den schwach markierten Kernen ermittelt. Dieses Zahlenverhältnis entspricht aber nicht $y : x$, denn ein kleiner Teil der durch die hohe Dosis getroffenen Kerne trägt nur eine schwache Markierung; umgekehrt werden auch bei der niedrigen Dosis einige Kerne stark markiert. Das genaue Zahlenverhältnis von $y : x$ wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem Vorversuch zur Grenzziehung zwischen den Markierungsintensitäten errechnet¹.

Ergebnisse

Der zeitliche Verlauf des Prozentsatzes markierter Mitosen nach einmaliger Applikation von ^3H -Thymidin ist in Abb. 1 dargestellt: Erste markierte Mitosen werden nach 1 Stunde radioaktiver Versuchszeit beobachtet, es kommt relativ schnell zu einem deutlichen Anstieg der Kurve, nach 4 Std ist der 100%-Wert erreicht. Zwischen der 6. und 10. Stunde nach Versuchsbeginn sinkt die Kurve wieder ab und erreicht nach 14 Std den Nullwert. Verglichen mit dem durch die Einzelergebnisse gut definierten Anstieg der Kurve ist ihr absteigender Schenkel durch die breitere Streuung der Einzelwerte unscharf. 18 Std, deutlicher 24 Std nach Versuchsbeginn steigt die Kurve wieder langsam an, wobei jedoch der Beginn einer neuen Welle markierter Mitosen nicht sicher bestimmt werden kann.

Aus dem 50%-Wert der *Prozent-markierte Mitosen-Kurve* lassen sich folgende Parameter des Zellzyklus im Stratum basale der Wangenmucosa bei der erwachsenen Ratte ableiten: G_2 -Phase 1 Std (ob < 1 Std, wurde nicht untersucht); S-Phase 7,5—8 Std; M-Phase ca. 1,5 Std; T_c (= Generationszeit) > 17 Std.

Die Prüfung der Abhängigkeit des ^3H -Indexes von der applizierten Dosis ergibt nahezu konstante Werte (50 μC : 19,2% ; 100 μC : 17,2% ; 500 μC : 16,5% ; 1000 μC : 18,5%), so daß diese Dosierungsbereiche für die Doppelmarkierung mit ^3H -Thymidin verwendet werden können.

Die Bestimmung der SK/ZK an 200 Basalzellen pro Ratte führt bei den allein mit 50 μC und den allein mit 500 μC ^3H -Thymidin markierten Tieren nach einstündiger radioaktiver Versuchszeit zu dem Verteilungsmuster der Abb. 2. Bei 20 SK/ZK als Grenze zwischen stark und schwach markierten Zellkernen ordneten wir von 400 durch 50 μC ^3H -Thymidin markierten Zellkernen 359 als schwach und 41 als stark markiert ein. Bei der Applikation von 500 μC ^3H -Thymidin fanden wir bei einer Grenze von 20 SK/ZK, 358 Kerne stark und 42 schwach markiert.

¹ Einzelheiten der Berechnung bei den Verfassern.

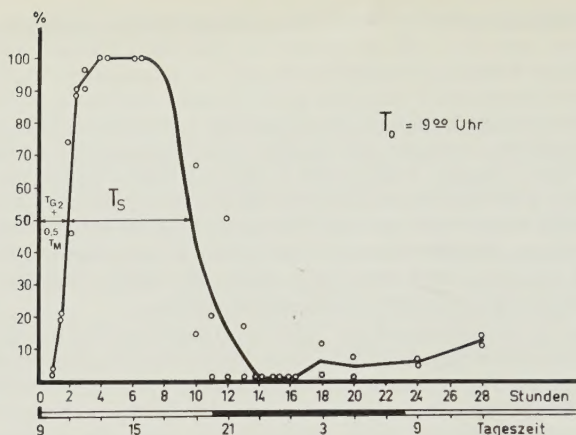


Abb. 1. Darstellung des Prozentsatzes markierter Mitosen im Stratum basale der Wangenschleimhaut der Ratte nach verschiedenen langen radioaktiven Versuchszeiten ($500 \mu\text{C } ^3\text{H-Thymidin i.p. um 9 Uhr. Uhrzeiten auf der Skala unter der Abszisse)$)

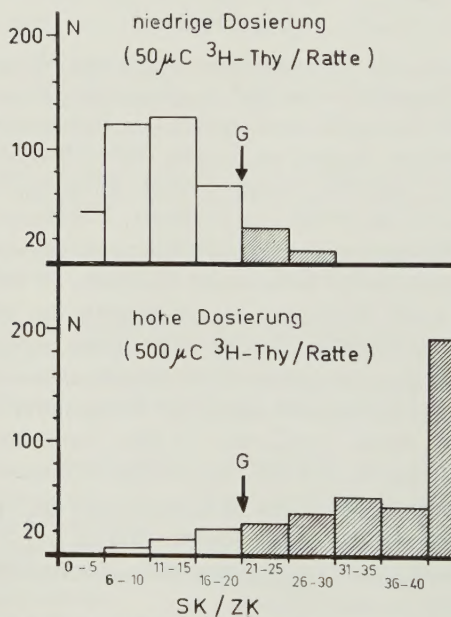


Abb. 2. Häufigkeitsverteilung der Silberkornzahl/Zellkern (SK/ZK) nach Applikation von $^3\text{H-Thymidin}$ in niedriger und hoher Dosierung. Auszählung an je 200 ZK/Ratte; oben die Summe aus den beiden Tieren mit niedriger Dosis, unten aus den beiden Tieren mit hoher Dosis. *G* Definierte Grenze zwischen schwach und stark markierten Zellkernen. Die stark markierten Anteile beider Kollektive sind schraffiert

Die Auswertung der *doppelt markierten ARG* an mindestens 1000 markierten Zellkernen/Ratte (Gruppe II b) ergab das in Tabelle 1 aufgeführte Zahlenverhältnis aus stark zu schwach markierten Kernen und die daraus errechnete Länge der S-Phase.

Tabelle 1. Bestimmung der S-Phasenlänge durch ^3H -Thymidin-Doppelmarkierung

	Zahlenverhältnis der stark/schwach markierten Zellkerne im ARG	Rechnerisch korrigiertes Zahlenverhältnis	S-Phasenlänge in Stunden
Ratte Nr. 1	809/198	890,58/116,42	7, 65
Ratte Nr. 2	823/177	909,23/90,77	10

Diskussion

Die Untersuchung des Prozentsatzes markierter Mitosen nach verschiedenen langer radioaktiver Versuchszeit zeigt die ersten markierten Mitosen 1 Std nach der Applikation des ^3H -Thymidins, was einer G_2 -Phase von maximal 1 Std entspricht (s. Abb. 1). Der nachfolgende schnelle Anstieg markierter Mitosen und das Erreichen des 100 %-Wertes sprechen dafür, daß die Häufigkeitsverteilung der S-Phasenlänge relativ eng um einen Mittelwert schwankt (Mendelsohn und Takahashi, 1971). Allerdings weist der flacher verlaufende Abfall der Kurve auf geringe Schwankungen in der Länge der S-Phase bei einzelnen Basalzellen hin. Im Hinblick auf die methodischen Grenzen dieses Untersuchungsverfahrens muß aber darauf hingewiesen werden, daß der absteigende Schenkel der Kurve wegen der Tag-Nacht-Periodik in der Höhe des Mitose-Indexes (Schell *et al.*, 1974) mit geringerer Sicherheit zu bestimmen ist als der aufsteigende Schenkel.

Aus der 50 %-Breite der Prozent-markierte-Mitosen-Kurve ergibt sich eine mittlere S-Phasenlänge von 7,5—8 Std. Vergleichbare Angaben über die S-Phasenlänge im Epithel der Wangenschleimhaut der Ratte liegen bisher nicht vor; unser Wert stimmt aber gut mit den in der Literatur mitgeteilten Daten über die S-Phasenlänge im Mundepithel der Maus und im Zungenepithel der Ratte überein (s. Tabelle 2). Nach 18 bzw. 20 Std findet sich ein Wiederanstieg der Kurve, der allerdings auffallend flach verläuft. Daher ist es nicht sicher, ob dieses Wiederanstiegen als Zeitspanne zwischen den Fußpunkten der 1. und der 2. Mitosewelle einen Hinweis auf die Generationszeit bietet ($T_c > 17$ Std). Der flache Verlauf läßt eher auf eine breite Streuung der Generationszeiten in den Basalzellen schließen.

Die Bestimmung der SK/ZK nach einmaliger Applikation von 50 μC bzw. 500 μC ^3H -Thymidin ergab deutliche Markierungsunterschiede bei beiden Dosierungen, wobei aber in einem engen Bereich eine Überschneidung der Markierungsintensitäten registriert wurde. Diese Überschneidung weist ebenfalls auf individuelle Schwankungen der Länge der S-Phase innerhalb der untersuchten Zellpopulation hin und beeinträchtigt möglicherweise die Anwendbarkeit der DNS-Doppelmarkierung zur Bestimmung der S-Phasenlänge.

Mit Hilfe der ^3H -Thymidin-Doppelmarkierung bestimmten wir die S-Phasenlänge beim einen Versuchstier mit $\sim 7,6$ Std, beim anderen mit ~ 10 Std. Die Grenzen dieses Verfahrens liegen darin, daß es wegen der Überschneidung der SK/ZK in den beiden Dosierungsbereichen nicht immer möglich ist, eine Kernmarkierung einem bestimmten Dosisbereich sicher zuzuordnen, so daß eine rechnerische Korrektur unter Berücksichtigung von an anderen Tieren des gleichen Kollektivs ermittelten Ergebnissen erforderlich wird. Zudem ist es bei der autoradiographi-

Tabelle 2. S-Phasenlänge im oralen Epithel von Maus und Ratte

Tier	Gewebe	Dauer der S-Phase in vivo	Autor
Maus	Zunge	10,0	Toto und Ojha (1962)
Maus	Wange		
	Zunge		
	Gaumen	8,0	Toto und Dhawan (1966)
Maus	Wange	7,2	
	Zunge	7,0	Cameron und Greulich (1963)
Maus	Zunge	7,3	Pilgrim und Maurer (1965)
Ratte	Zunge	7,7	Pilgrim und Maurer (1965)
Ratte (Fetus)	Zunge	5,6	Wegener, Hollweg und Maurer (1964)

schen Auswertung schwierig, die relative Anzahl der schwach markierten Zellkerne sicher zu bestimmen, da es z.B. leichter möglich ist, einen schwach markierten als einen stark markierten Kern zu übersehen. Ferner kann die Markierung eines Kernes so schwach sein, daß sie die Grenze zum Nulleffekt unterschreitet und damit der Auswertung entgeht. Rechnerisch wirkt sich aber die Zahl der schwach markierten Zellkerne bei der Bestimmung der S-Phasenlänge besonders stark aus.

Wegener *et al.* (1964) kamen bei der vergleichenden Anwendung des %-markierte-Mitosen-Verfahrens und der Doppelmarkierung mit ^3H -Thymidin bei verschiedenen Zellarten der *fetalen Ratte* zu identischen Werten der S-Phasenlänge. Wir fanden bei unseren Untersuchungen mit den beiden Verfahren an der Wangenschleimhaut der *erwachsenen Ratte* unterschiedliche Werte. Die Konstanz der Ergebnisse von Wegener *et al.* (1964) wird dadurch erklärbar, daß bei fetalen Ratten anscheinend keine größeren Schwankungen von T_s um einen mittleren Wert vorkommen und daß also bei diesen Tieren die Doppelmarkierung mit ^3H -Thymidin besser als bei erwachsenen Ratten anwendbar ist.

Zusammenfassend zeigt sich, daß bei der erwachsenen Ratte das %-markierte-Mitosen-Verfahren besser zur Bestimmung der mittleren S-Phasenlänge im Stratum basale der Wangenschleimhaut geeignet ist als die Doppelmarkierung mit ^3H -Thymidin. Die dargelegte Problematik der Doppelmarkierung in vivo macht es ratsam, die Anwendbarkeit dieses Verfahrens zur Bestimmung der Länge der S-Phase am inkubierten epidermalen Gewebe vergleichend zu prüfen.

Wir danken Frau E. Teubner und Frau H. Albers für ihre technische Unterstützung.

Literatur

- Cameron, J. L., Greulich, R. C.: Evidence for an essentially constant duration of DNA-synthesis in renewing epithelia of the adult mouse. *J. Cell Biol.* **18**, 31—40 (1963)
- Mendelsohn, M. L., Takahashi, M.: A critical evaluation of the fraction of labeled mitoses method as applied to the analysis of tumor and other cell cycles. In: *The cell cycle and cancer* (ed. R. Baserga), p. 58—95. New York: Marcel Dekker Inc. 1971

- Pilgrim, Ch., Maurer, W.: Autoradiographische Untersuchung über die Konstanz der DNS-Verdopplungsdauer bei Zellarten von Maus und Ratte durch Doppelmarkierung mit ^3H - und ^{14}C -Thymidin. *Exp. Cell Res.* **37**, 183—199 (1965)
- Quastler, H., Sherman, F. G.: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* **17**, 420—438 (1959)
- Schell, H., Schmid, G. H.: Autoradiographische Untersuchungen über den Einfluß von Cyproteronacetat auf die epidermale Proliferation der männlichen Ratte. *Arch. Derm. Forsch.* **248**, 89—98 (1973)
- Schell, H., Schmid, G. H., Hornstein, O. P., Zeissler, H. J.: Untersuchungen über die Tagesperiodik des ^3H -Indexes im Epithel der Wangenschleimhaut und der Rückenepidermis der männlichen Ratte. *Arch. Derm. Forsch.* **250**, 253—260 (1974)
- Schmid, G. H., Hornstein, O. P.: Autoradiographische in-vitro-Untersuchungen über den Einfluß der Inkubationsdauer auf die DNA-Synthese psoriatischer Epidermiszellen von Stanzbiopsien im Glutamin-freien Nährmedium. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* **15**, 165—176 (1974)
- Schmid, G. H., Hornstein, O. P., Popp, E.: Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese in der Wangenschleimhaut und im Zungenepithel verschieden alter Ratten. *Arch. Derm. Forsch.* **246**, 236—248 (1973)
- Toto, P. D., Dhawan, A. S.: Generation cycle of oral epithelium in 400-day-old mice. *J. dent. Res.* **45**, 948—950 (1966)
- Toto, P. D., Ojha, G.: Generation cycle of oral epithelium in mice. *J. dent. Res.* **41**, 388—391 (1962)
- Wegener, K., Hollweg, S., Maurer, W.: Autoradiographische Bestimmung der DNS-Verdopplungszeit und anderer Teil-Phasen des Zellzyklus bei fetalen Zellarten der Ratte. *Z. Zellforsch.* **63**, 309—326 (1964)

Prof. Dr. O. P. Hornstein
Dr. G. H. Schmid
Dr. H. Schell
Dermatologische Univ.-Klinik Erlangen
D-8520 Erlangen
Hartmannstr. 14
Bundesrepublik Deutschland



Lebenslauf

Am 21.7.1948 wurde ich, Hans-Ulrich Meisel, als fünftes Kind des Pfarrers Hans Meisel und seiner Ehefrau Gertrud, geborene Federschmidt, in Gärtenroth, Kreis Lichtenfels, geboren.

Die Volksschule besuchte ich von 1954 - 1959 in Mistelbach, Kreis Bayreuth. 1959 wechselte ich an das Humanistische Gymnasium Christian Ernestinum in Bayreuth über. Mit dem Schuljahr 1960/61 kam ich an das Humanistische Gymnasium bei St. Anna in Augsburg, wo ich im Juni 1969 die Reifeprüfung bestand. Von August 1969 bis Februar 1970 arbeitete ich als Hilfspfleger auf der Inneren Abteilung des Krankenhauses Haunstetten.

Mit dem Studium der Humanmedizin konnte ich im Sommersemester 1970 an der Universität Erlangen-Nürnberg beginnen. Ich legte alle Prüfungen gemäß dem Studienzeitplan ab, zuletzt die ärztliche Prüfung am 28.1.1976.

Hans-Ulrich Wilhelm Meisel

